

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001 年 9 月 7 日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/64930 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/88, C07K 14/02, 16/08, C12N 5/10, A61K 9/51, 47/42, 48/00, 37/02, 37/54, 31/70, 45/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/00926
- (22) 国際出願日: 2001 年 2 月 9 日 (09.02.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-52525 2000 年 2 月 28 日 (28.02.2000) JP
特願2001-31308 2001 年 2 月 7 日 (07.02.2001) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒田俊一 (KURODA, Shun' ichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府吹田市上山田7番C-104号 Osaka (JP). 谷澤克行 (TANIZAWA, Katsuyuki) [JP/JP]; 〒563-0214 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2 Osaka (JP). 妹尾昌治 (SENO, Masaharu) [JP/JP]; 〒703-8273 岡山県岡山市門田文化町2-10-13 Okayama (JP). 近藤昭彦 (KONDO, Akihiko) [JP/JP]; 〒657-0015 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1-2-806 Hyogo (JP). 上田政和 (UEDA, Masakazu) [JP/JP]; 〒162-0837 東京都新宿区納戸町6 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROTEIN HOLLOW NANO PARTICLES, TRANSPORTER WITH THE USE OF THE SAME AND METHOD OF INTRODUCING SUBSTANCE INTO CELLS

(54) 発明の名称: タンパク質中空ナノ粒子とそれを用いた物質運搬体、ならびに細胞への物質導入方法

(57) Abstract: Hollow nano particles composed of a hepatitis B virus (HBV) surface antigen protein and a biorecognition molecule introduced therinto which are usable as a protein capable of forming particles as a common means of specifically and safely transporting and introducing substances (gene, protein, compound, etc.) into the target cells or tissue.

(57) 要約:

目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、蛋白質、化合物等）を特異的、かつ安全に運搬、導入するための汎用的な方法として、粒子形成能を有する蛋白質として、B 型肝炎ウイルス (Hepatitis B Virus : HBV) 表面抗原蛋白質に、生体認識分子を導入した中空ナノ粒子を提供する。

WO 01/64930 A1

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

明 細 書

タンパク質中空ナノ粒子とそれを用いた物質運搬体、
ならびに細胞への物質導入方法

技術分野

この出願の発明は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されている中空ナノ粒子に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、特定の細胞および組織に物質を導入するための運搬体として使用することができる中空ナノ粒子に関するものである。

背景技術

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。とくに、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所で有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

また、最近の分子細胞生物学の分野においても特定細胞への遺伝子導入は必要不可欠な技術として盛んに研究されている。さらに、ヒトゲノム計画の進展により各種疾患の遺伝的な背景が明らかになりつつある現在、このような細胞および組織に対する特異性の高い遺伝子導入法が確立されれば遺伝子治療の分野での応用も可能となる。

細胞に遺伝子を導入する方法としては、これまでに、遺伝子を巨大分子化してエンドサイトーシスによって遺伝子を取込ませる方法

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

(リン酸カルシウム法、リポフェクタミン法) や、電気パルス刺激により、細胞膜に穿孔を開け、遺伝子を流入させる方法(エレクトロポレーション法、遺伝子銃法) が知られており、いずれも今日では分子生物学的実験において、一般的に実施されている手法である。

これらの方法は簡便であるが、細胞を直接、物理的に傷つけ、遺伝子導入部位を外科的に露出させる必要があるため、生体内部の細胞や組織には容易に適用できない。また、100%近い導入率を得ることは難しい。

一方、安全性の高い物質導入方法としてはリポソーム法が知られている。この方法は、細胞を傷つけることがないため、生体内部の細胞や組織にも適用することが可能である。しかし、単純な脂質であるリポソームに高度な細胞および組織特異性を付与することは困難であり、さらに、*in vivo* での遺伝子導入率は、要求される値に比べてはるかに低いという問題がある。

最近になって、ウィルスDNAに目的の遺伝子を組み込み、感染性ウィルスを生成して遺伝子導入を行う技術が開発された。この方法は導入部位を露出する必要がなく、個体にも応用でき、導入効率も100%近い画期的な方法として注目されるが、ウィルスが広範囲の細胞に非特異的に感染するため目的の細胞以外にも遺伝子が導入されてしまうという重大な問題がある。また、ウィルスゲノム本体が染色体に組み込まれ、将来予期できぬ副作用を引き起こす可能性があるため、実際には疾病の初期治療等には用いられず、末期症状の患者に適用されるに留まっているのが現状である。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、目的とする細胞や組織に、物質(遺伝子、タンパク質、化合物等)を特異的、かつ安全に

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

運搬、導入するための汎用的な方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第 1 には、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を提供する。

第 2 には、この出願の発明は、真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を提供する。

第 3 には、この出願の発明は、真核細胞が酵母または遺伝子組換え酵母のいずれかから選択されること、および第 4 には、真核細胞が昆虫細胞であることを前記第 2 の発明の中空ナノ粒子の態様として提供する。

また、第 5 には、この出願の発明は、粒子を形成するタンパク質が B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である前記のいずれかの中空ナノ粒子を提供する。

さらに、この出願の発明は、第 6 には、該 B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質が抗原性を減少させた B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である前記の中空ナノ粒子を提供する。

この出願の発明は、また、第 7 には、生体認識分子が細胞機能調節分子であること、第 8 には、生体認識分子が抗原であること、第 9 には、生体認識分子が抗体であること、第 10 には、生体認識分子が糖鎖であることを前記のいずれかの中空ナノ粒子の態様として提供する。

第 11 に、この出願の発明は、さらに、前記のいずれかの中空ナ

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

ノ粒子に細胞導入物質が内包されていることを特徴とする物質運搬体をも提供する。

また、この出願の発明は、第 11 の発明の物質運搬体において、第 12 には、細胞導入物質が遺伝子であること、第 13 には、細胞導入物質がタンパク質であること、第 14 には、細胞導入物質が細胞内で細胞傷害性を示す RNase であること、第 15 には、細胞導入物質が化合物であることを態様として提供する。

さらに、この出願の発明は、前記第 11 ないし第 15 の発明のいずれかの物質運搬体の製造方法として、第 16 には、前記第 1 ないし第 10 のいずれかの中空ナノ粒子に、エレクトロポレーション法により細胞導入物質を内包させること、第 17 には、超音波法により細胞導入物質を内包させること、第 18 には、単純拡散法により細胞導入物質を内包させること、第 19 には、電荷を有する脂質を用いて細胞導入物質を内包させることを提供する。

そして、第 20 には、この出願の発明は、前記第 1 から第 10 の発明のいずれかの中空ナノ粒子を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法を、第 21 には、前記第 11 から第 15 のいずれかの物質運搬体を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法を提供する。

そしてさらに、第 22 には、この出願の発明は、少なくとも前記のいずれかの物質導入方法を用いて、特定細胞または組織へ物質を運搬する操作を含む疾患の治療方法をも提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の実施例における HBsAg 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8 は、表面抗原における各

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

部位の働きを示している。(1 : 放出抑制、2 : レセプター、3 : 糖鎖1、4 : 血清重合アルブミンレセプター、5 : 膜貫通、6 : 安定化、7 : 糖鎖2、8 : 膜貫通 低重合化・分泌)

図2は、この発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いたHBsAg粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。

(a) 遺伝子組換え酵母の作成、(b) High-Pi培地における培養、(c) 8S5N-P400培地における培養、(d) 破碎、(e) 密度勾配遠心分離、(f) HBsAg粒子をそれぞれ示す。

図3は、この発明の実施例において、GFPプラスミドを導入したHBsAg粒子とHepG2を接触させた際のHepG2の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。(a) HBsAg粒子使用(プラスミド量: 8ng)、(b) 脂質(リポソーム)使用(プラスミド量: 800ng)、(c) ベクターのみ(プラスミド量: 800ng)をそれぞれ示す。

図4は、GFPを封入されたHBsAg粒子によって、ヒト肝癌由来細胞(NUE)内においてもHepG2と同程度にGFPが発現されることを表す共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。(a) HepG2細胞、(b) NUE細胞をそれぞれ示す。

図5は、HBsAg粒子が、ヒト肝癌由来細胞(HuH-7)に極めて特異的にGFPを導入できることを表す共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。(a) ヒト肝癌由来細胞(HuH-7)を移植された胆癌マウスの腫瘍部(蛍光あり)、(b) マウスの通常肝臓(蛍光なし)

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明の中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク

WO 01/64930

CT/JP01/00926

質に生体認識分子を導入することによって、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することを可能とするものである。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウィルスから得られるサブウィルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウィルス (Hepatitis B Virus: HBV) 表面抗原タンパク質等が例示される。

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、酵母や遺伝子組換え酵母、昆虫細胞等が適用できる。

発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で前記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している (*J. Bio. Chem.*, Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992)。このような粒子は、HBVゲノムやHBVタンパク質を全く含まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される

WO 01/64930

CT/JP01/00926

点で好適である。

一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系はバキュロウイルスを用いた系で、ウイルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的に行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものが Invitrogen 社により開発され、市販されている。したがって、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

この出願の発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変したり、種々の物質（DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、および薬剤等）を粒子内に導入することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

もちろん、粒子形性能を有するタンパク質は、前記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来

WO 01/64930

CT/JP01/00926

の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを生体認識分子として用いてもよい。

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子としては、たとえば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。

この出願の発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子に、目的細胞または組織に導入したい物質（細胞導入物質）を内包させることによって、細胞特異性を有する物質運搬体が得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質とは、例えばDNA、RNAなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

具体的には、既に発明者らにより報告されたヒトRNase 1 (Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Enomoto K, Psarras K, Kitajima M, Yamada H, Seno M *Life Sci.* 1996;58(21):1901-8) またはRNase 3 (別名ECP: eosinophil cationic protein; Mallorqui-Fernandez G, Pous J, Peracaula R, Aymami J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Ruth FX, Coll M; *J Mol Biol.* 2000 Jul 28;300(5):1297-307.) 等が適用される。

これらのタンパク質は、細胞外で作用させても細胞傷害活性を示さないが、細胞内に取り込まれると細胞傷害活性を示すことが分かっている。そこで、これらのRNaseを内包させた本願発明の物

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

質運搬体を用いれば、細胞や組織に選択的に細胞傷害活性のあるタンパク質の強制発現を行うことができ、新しい癌治療方法として期待される。

また、これらの細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に導入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。

そして、これらのタンパク質中空ナノ粒子、あるいは物質運搬体を用いて、*in vivo* あるいは *in vitro* で細胞、または組織に特異的に物質を導入することが可能となる。さらには、前記の RNAase を用いた例のように、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子や物質運搬体を用いて、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

実施例

以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸（pre-S2 peptide）が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸（pre-S1 peptide）が付加したものである。

HBsAg Lタンパク質の Pre-S 領域（pre-S1, pre-S2）は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

実施例A 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

発明者らによって報告された *J. Bio. Chem.*, Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992 記載の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R⁻株）を、合成培地 High-Pi および 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg Lタンパク質粒子を発現させた。（図2a、b）

定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical Co. 製）を用いて、whole cell extract を準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて分離して、

WO 01/64930

CT/JP01/00926

銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行なった。

これより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

実施例B HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)をbuffer A溶液(7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween 80)100mlに懸濁し、グラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図2c、d)

(2) 次に、上清を0.75倍容の33%(w/w)PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、30分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween 80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

(3) 再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法(Western Blotting)(1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体)によりHBsAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分をTween 80を含まないbuffer A溶液で透析した。

(4) (3)で得られた透析液(12ml)を5~5.0%の勾配をかけたショ糖に重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後、(3)と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAgを含む画分を尿素とTween 80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した。((2)~(4):図2e)

WO 01/64930

CT/JP01/00926

(5)(4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター(Ultra Filter) Q2000(アドバンテック社製)を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(図2f)

CsCl平衡遠心分離後のウェスタンブロット(3)の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。

一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHBsAg粒子を37℃で12時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、銀染色により同定を行なった。

その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

実施例1 ヒト肝癌細胞HepG2におけるHBsAg粒子による遺伝子導入

指数増殖期にあるヒト肝癌細胞HepG2を 1×10^5 cells/well になるように、3.5cmガラス底皿シャーレに植菌し、37℃、5%CO₂存在下で10%ウシ胎児血清を含むD-MEMを用いて一晩培養した。翌日、HBsAg粒子と緑色蛍光タンパク質発現プラスミド(GFP expression plasmid pTB701-hGFP)を混合し、エレクトロポレーションを行なった後、この試料をHepG2培養液へ混合し、37℃、5%CO₂存在下で4日間培養した。

HepG2内でのGFPの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。

HepG2を用いてHBsAg粒子の遺伝子導入効率を評価した。

WO 01/64930

CT/JP01/00926

間隔 4 mm のキュベットを使用して、110 V、950 μ F の条件でエレクトロポレーションを行なった HBsAg-プラスミドを HepG2 へ形質移入させ、37°C、5% CO₂ 存在下で D-MEM を用いて 4 日間培養した。

HepG2 の共焦点レーザー写真を図 3 に示した。図 3 (a) を図 3 (b)、(c) と比較すると、図 3 (a) は図 3 (b) の約 200 倍の効率を示しており、HBsAg 粒子による GFP expression plasmid の導入効率は非常に高いものであることが分かった。

実施例 2 HepG2 以外のヒト肝癌細胞における HBsAg 粒子による遺伝子導入

実施例 1 に記載の方法に従って、ヒト肝癌由来細胞として HuH-7 (JCRB0403) および NUE (防衛医科大学校寄生虫学講座 多田隈卓史教授より分譲) を準備した。

また、陰性対照として、ヒト大腸癌由来細胞 W i D r (ATCC CCL-218)、H T 2 9 (ATCC HTB-38)、S W 1 1 1 6 (ATCC CCL-233)、ヒト悪性黒色腫由来細胞 S E K 1 (JCRB0620)、ヒト扁平上皮癌由来細胞 A 4 3 1 (JCRB9009) を、それぞれ 3.5 cm ガラス底皿シャーレ上に培養し、GFP 発現プラスミド (pEGFP-F (Clontech 社)) 8 ng を含む HBsAg 粒子を 10⁵ 細胞に感染させ、4 日間培養を継続した。その後、各細胞内での GFP の発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、HuH-7 及び NUE 細胞で、HepG2 細胞と同程度の蛍光が観察された (図 4)。

一方、ヒト肝臓由来でない細胞では、いずれも GFP の蛍光が観察されなかった。

以上より、この発明の HBsAg 粒子を用いて、培養細胞レベル

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

で、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子を導入できることが示された。

実施例 3 ヒト肝癌を移植したヌードマウスに対する H B s A g 粒子による遺伝子導入

胆癌マウスは、ヌードマウス（系統：BALB/c nu/nu、微生物学的品質：S P F、性別：オス 5 週齢）の両側背部皮下に、実施例 2 で使用したヒト腫瘍株（H u H - 7 及び W i D r）をそれぞれ 1×10^7 細胞皮下に注射し、移植腫瘍が直径 2 c m 程度の固形癌になるまで 2 ～ 6 週間生育させて得た。

実施例 2 で記載した方法により得た G F P 発現プラスミド（pEGFP-F）2. 5 μ g を含む H B s A g 粒子 1 0 μ g を、マウス腹腔内に 2 6 G 注射針を使用して投与した。投与後 4 日目にマウスを屠殺し、腫瘍部、肝臓、脾臓、腎臓、腸管を摘出し、G F P 用樹脂包埋キット（Technovit7100）を用いて組織を固定・包埋した。

具体的には、固定は 4 % 中和ホルムアルデヒドに浸漬して行い、脱水は 7 0 % E t O H で室温 2 時間、9 6 % E t O H で室温 2 時間、1 0 0 % E t O H で室温 1 時間、予備浸漬は 1 0 0 % E t O H / Technovit7100 等量混合液で室温 2 時間行った。その後、Technovit7100 で室温 2 4 時間以内の浸漬を行い、取り出した後、室温で 1 時間および 3 7 °C で 1 時間静置して重合反応させた。

常法に従って、切片を作製し、同時にヘマトキシンエオリン染色（一般的な組織染色）を行って、蛍光顕微鏡により H B s A g 粒子投与群と非投与群の G F P による蛍光を比較した（図 5）。

図 5 より、ヒト肝癌由来 H u H - 7 細胞による胆癌マウスの腫瘍部に G F P に由来する蛍光を認めた。しかし、同マウスより同時に摘出した肝臓、脾臓、腎臓、腸管には蛍光を認めなかった。さらに、

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

ヒト大腸癌由来 W i D r 細胞による胆癌マウスの腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、腸管及び、H B s A g 粒子非投与群にも蛍光を認めなかった。

以上より、H B s A g 粒子を用いることにより、実験動物レベルでも、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子導入が可能であることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

実施例 C 生体認識分子提示用汎用型 H B s A g 粒子 (H B s A g - N u l l 粒子) の作製

H B s A g 粒子はヒト肝細胞特異的に感染することができるが、その高い感染性を担う同粒子表面に提示されている肝細胞認識部位は、pre-S1 領域の 3 から 77 アミノ酸残基に含まれていることが判明している (Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P., *J. Virol.* 1999, Mar; 73(3):2052-7)。

ここでは、H B s A g 粒子の粒子形成能を保ちながら、肝細胞に対する高い感染能を欠失し、かつ任意の生体認識分子を粒子表面に提示することができる改変 H B s A g 粒子 (以降 H B s A g - N u l l 粒子と呼称) の作製法を記す。

実施例 A に記載された p G L D L I I P 39-R c T プラスミドのヒト肝細胞認識部位をコードする遺伝子領域を欠失させ、同時に制限酵素 *NotI* サイト (gcggccgc) を挿入するために、配列番号 1 のオリゴヌクレオチドと配列番号 2 のオリゴヌクレオチドを P C R 用プライマーとして使用して、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いた P C R 法を p G L D L I I P 39-R c T プラスミドに対して行った。

具体的には、耐熱性 D N A ポリメラーゼとして *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) を用い、P C R スケジュールは、95℃

WO 01/64930

CT/JP01/00926

30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返した。その後、PCR産物を制限酵素 *DpnI* で処理し、大腸菌 DH5 α に形質転換し、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入された pGLDLIIP39-RcT プラスミドを選抜した。(以下、pGLDLIIP39-RcT (null) と呼ぶ)。

実施例A記載の方法で、pGLDLIIP39-RcT (null) プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg-NuII 粒子を発現させた。

定常成長期(培養開始から72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製)を用いて菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗Sモノクローナル抗体(フナコシ社)を用いる Western 法により HBsAg-NuII の同定を行った。

これより、HBsAg-NuII は分子量約42kDaのタンパク質であることが明らかになった。

さらに、実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体(約26g)から、約3mgの精製HBsAg-NuII 粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット(ダイナボット社)を用いて、HBsAg 粒子及びHBsAg-NuII 粒子のS抗原性(HBsAgの粒子化度合い)を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例4 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-NuII 粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、実施例Cで得られた肝細胞に対する高い感染能を欠失し、かつ任意の生体認識分子を粒子表面に

WO 01/64930

CT/JP01/00926

提示することができるHBsAg-NuI I粒子内部にGFP発現用プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を封入し、HepG2細胞と実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

しかし、いずれの細胞からもGFPによる蛍光は観察されなかった。このことから、HBsAg-NuI I粒子がヒト肝臓由来細胞に対する高い感染能を消失していることが示された。

実施例5 ヒト由来癌細胞を移植したヌードマウスに対するHBsAg-NuI I粒子による遺伝子導入

実施例3に記載の方法に従って、ヒト腫瘍株(HuH-7及びWidR)を移植した胆癌マウスを作製し、GFP発現プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を含むHBsAg-NuI I粒子を投与したが、腫瘍部、及び全ての主要臓器においてGFPによる蛍光は観察されなかった。

このことから、HBsAg-NuI I粒子があらゆる臓器に対して感染性を有さないことが確認された。

実施例D 上皮成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)提示型HBsAg粒子(HBsAg-EGF粒子)の作製

EGF受容体は極めて多くの細胞が細胞表層に発現していることが知られており、特にある種の癌(食道癌、大腸癌等)の増悪に関係していることが分かっている。そこで、EGF受容体を標的とするHBsAg粒子を作製すれば、EGF受容体を発現する癌組織に対する有効な治療手段になると考えられる。

ここでは、実施例C記載の方法によるHBsAg-NuI I粒子を基にした、EGF提示型HBsAg粒子(HBsAg-EGF粒子)の作製法を記す。

WO 01/64930

CT/JP01/00926

ヒト由来 EGF 前駆体 cDNA 断片 (Bell GI, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador R *Nucleic Acids Res* 1986 Nov 11;14(21):8427-46) を鋳型として、成熟型ヒト EGF 領域 (53 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片を PCR 法により常法どおり増幅した。

用いた 2 種類の PCR プライマーは、センス側が配列番号 3 のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号 4 のオリゴヌクレオチドで、両方とも 5' 末端側に制限酵素 *NotI* サイト (gcggccgc) を有するように設計した。

PCR 産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的の cDNA を含むバンド (約 170 bp) を回収し、TOP0 TA Cloning kit (Invitrogen 社) を用いて pCR2.1-TOP0 ベクター (Invitrogen 社) にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素 *NotI* で切断して、約 170 bp の目的 DNA 断片を回収し、pGLDLIIP39-RcT (null) を制限酵素 *NotI* で開裂させたものと TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて閉環結合させ、大腸菌 DH5 α を形質転換した。

塩基配列解析により選抜を行い、挿入した EGF 遺伝子が HBsAg 遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドを pGLDLIIP39-RcT-EGF と命名した。

実施例 A の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcT-EGF プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養して、HBsAg-EGF 粒子を発現させた。

定常成長期 (培養開始から 72 時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製) を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGE を用いて分離して、

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

銀染色並びに抗ヒトEGFポリクローナル抗体（Santa Cruz 社）を用いる Western 法により HBsAg-EGF の同定を行った。

これより、HBsAg-EGF は分子量約 50 kDa のタンパク質であることが明らかになった。

実施例 B に記載の方法に従って、培地 2.5 L 由来の上記菌体（約 26 g）から、約 3 mg の精製 HBsAg-EGF 粒子を得た。HBsAg の粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg 粒子および HBsAg-EGF 粒子の S 抗原性（HBsAg の粒子化度合い）を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

したがって、HBsAg-EGF 粒子が HBsAg 粒子と同様に得られていることが示された。

実施例 6 ヒト由来癌細胞における HBsAg-EGF 粒子による遺伝子導入

実施例 2 に記載の方法に従って、HBsAg-EGF 粒子内部に GFP 発現用プラスミド pEGFP-F ベクター（Clontech 社）を封入し、HepG2 細胞及び実施例 2 に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

その中で、EGF レセプターを大量に細胞表面に発現している A431 細胞において GFP による強い蛍光を観察することができた。

これより、HBsAg-EGF 粒子が EGF レセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。また、培養細胞レベルで改造 HBsAg 粒子に任意の生体認識能を付与できることが示された。

実施例 7 ヒト由来癌細胞を移植したヌードマウスに対する HBsAg-EGF 粒子による遺伝子導入

WO 01/64930

CT/JP01/00926

実施例 3 に記載の方法に従って、ヒト腫瘍株 (A 4 3 1、H u H - 7、W i D r) を移植した胆癌マウスを作製し、G F P 発現プラスミド (p E G F P - F (Clontech 社)) を含む H B s A g - E G F 粒子を投与したところ、A 4 3 1 による腫瘍部に強力な G F P による蛍光が観察された。一方、他細胞による腫瘍部及び主要臓器においては G F P による蛍光は観察されなかった。

これより、H B s A g - E G F 粒子が E G F レセプターを著量発現している細胞に特異的に感染できること、および主要臓器に対しては感染性を有していないことが確認された。

したがって、任意の生体認識分子を融合もしくは付加した H B s A g - N u l l 粒子は、実験動物レベルでも、あらゆる組織及び臓器に物質を特異的に運搬できる粒子となることが示された。

実施例 E ベータセルリン (B T C : Betacellulin) 提示型 H B s A g 粒子 (H B s A g - B T C 粒子) の作製

B T C は E G F ファミリーの一つであるが、発現部位は E G F と異なる。特に、血糖調節機構に重要な役割を担う膵臓内ランゲルハンス島 β 細胞の分化に重要な役割を担うことが判明している。そこで、B T C 受容体を標的とする H B s A g 粒子を作製すれば、B T C 受容体を発現する組織に対する有効な物質運搬手段とすることができ、 β 細胞に起因する糖尿病の治療にも役立つことが期待される。

ここでは、実施例 C 記載の方法によって作製された H B s A g - N u l l 粒子を基に、B T C 提示型 H B s A g 粒子 (H B s A g - B T C 粒子) の作製法を記す。

ヒト由来 B T C 前駆体 c D N A 断片 (Sasada R, Ono Y, Taniyama Y, Shing Y, Folkman J, Igarashi K; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993 Feb 15; 190(3):1173-9.) を鋳型として、B T C 受容体に結

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

合能を示すことが知られている部分（GHFSR-----VDLFY の 48 アミノ酸残基）をコードする遺伝子断片を PCR 法により常法どおり増幅した。

用いた 2 種類の PCR プライマーは、センス側が配列番号 5 のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側は配列番号 6 のオリゴヌクレオチドで、両方とも 5' 末端側に制限酵素 *NotI* サイト（gcggccgc）を有するように設計した。

PCR 産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的の cDNA を含むバンド（約 160 bp）を回収し、TOP0 TA Cloning kit（Invitrogen 社）を用いて pCR2.1-TOP0 ベクター（Invitrogen 社）にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素 *NotI* で切断して、約 160 bp の目的 DNA 断片を回収し、pGLDLIIP39-RcT（null）を制限酵素 *NotI* で開裂させたものと TaKaRa Ligation kit ver. 2（TaKaRa 社）を用いて閉環結合させ、大腸菌 DH5 α を形質転換した。塩基配列解析により選抜を行い、挿入した BTC 遺伝子が HBsAg 遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドを pGLDLIIP39-RcT-BTC と命名した。

実施例 A と同様の方法で pGLDLIIP39-RcT-BTC プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg-BTC 粒子を発現させた。

定常成長期（培養開始から 72 時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical 社製）を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGE を用いて分離し、銀染色並びに抗 BTC ポリクローナル抗体（岡山大工学部妹尾氏作製）を用いる Western 法により HBsAg-BTC の同定

WO 01/64930

CT/JP01/00926

を行った。

これより、HBsAg-BTCは分子量約50kDaのタンパク質であることが明らかになった。

実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体(約26g)から、約3mgの精製HBsAg-BTC粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット(ダイナボット社)を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg-BTC粒子のS抗原性(HBsAgの粒子化度合い)を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例8 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-BTC粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、HBsAg-BTC粒子内部にGFP発現用プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を封入し、BTCレセプター発現しているラット脾臓由来細胞AR42J、BTCレセプターを発現していないヒト肺癌由来H69細胞、さらには、実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

その中で、BTCレセプターを大量に細胞表面に発現しているAR42J細胞においてGFPによる強い蛍光を観察することができた。

これより、HBsAg-BTC粒子がBTCレセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。

実施例F 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF:basic fibroblast growth factor) 提示型HBsAg粒子(HBsAg-bFGF粒子)の作製

個体内での癌組織の増殖において、癌細胞は周辺組織に対し血管

WO 01/64930

CT/JP01/00926

誘導を促すシグナルを発することが知られている（血管新生または angiogenesis）。これには、数多くの成長因子（別名 angiogenesis factor）が関与することが知られているが、その中心的な役割を担っているのが b F G F であり、周辺組織では b F G F レセプターが亢進しているとの報告もある（Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J *Lancet* 1994 Jul 9; 344 (8915): 82-6.）。

そこで、b F G F 受容体を標的とする H B s A g 粒子を作製すれば、b F G F 受容体を発現する組織に対する有効な物質運搬手段になると考えられ、癌周辺組織における血管新生現象の抑制を効果的に誘導する治療に役立たせることも可能である。

ここでは、実施例 C 記載の方法によって作製された H B s A g - N u l l 粒子を基に、b F G F 提示型 H B s A g 粒子（H B s A g - b F G F 粒子）の作製法を記す。

ヒト由来 b F G F 前駆体 c D N A 断片（Kurokawa T, Sasada R, Iwane M, Igarashi K *FEBS Lett.* 1987 Mar 9; 213(1): 189-94.）を鋳型として、b F G F 受容体に結合能を示すことが知られている部分（PALPED-----PMSAKS の 1 4 6 アミノ酸残基）をコードする遺伝子断片を P C R 法により常法どおり増幅した。

用いた 2 種類の P C R プライマーは、センス側が配列番号 7 のオリゴヌクレオチドと、アンチセンス側が配列番号 8 のオリゴヌクレオチドで、両方とも 5' 末端側に制限酵素 *Not* I サイト（gcggccgc）を有するように設計した。

P C R 産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的の c D N A を含むバンド（約 4 5 0 b p）を回収し、TOPO TA Cloning kit（Invitrogen 社）を用いて c C R 2. 1 - T O P O ベクター

WO 01/64930

CT/JP01/00926

(Invitrogen 社) にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素 *NotI* で切断して、約 450bp の目的 DNA 断片を回収し、pGLDLIP39-Rct (null) を制限酵素 *NotI* で開裂させたものと TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて閉環結合させ、大腸菌 DH5 α を形質転換した。塩基配列解析により選抜を行い、挿入した bFGF 遺伝子が HBsAg 遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドを pGLDLIP39-RCT-bFGF と命名した。

実施例 A と同様の方法で、pGLDLIP39-RCT-bFGF プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養して HBsAg-bFGF 粒子を発現させた。

定常成長期（培養開始から 72 時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製) を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGE を用いて分離し、銀染色並びに抗 bFGF モノクローナル抗体 3H3 (和光純薬) を用いる Western 法により HBsAg-bFGF の同定を行った。

これより、HBsAg-bFGF は分子量約 58kDa のタンパク質であることが明らかになった。

実施例 B に記載の方法に従って、培地 2.5L 由来の上記菌体（約 26g）から、約 2mg の精製 HBsAg-bFGF 粒子を得た。HBsAg の粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg 粒子及び HBsAg-bFGF 粒子の S 抗原性（HBsAg の粒子化度合い）を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例 9 ヒト由来癌細胞における HBsAg-bFGF 粒子による遺伝子導入

WO 01/64930

CT/JP01/00926

実施例 2 に記載の方法に従って、HBsAg-bFGF 粒子内部に GFP 発現用プラスミド (pEGFP-F (Clontech 社)) を封入し、bFGF レセプター発現しているヒト乳癌由来細胞 MDA-MB-231、bFGF レセプターを発現していないヒト扁平上皮癌由来 A431 細胞および実施例 2 に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

その中で、bFGF レセプターを大量に細胞表面に発現している MDA-MB-231 細胞において GFP による強い蛍光を観察することができた。

これより、HBsAg-bFGF 粒子が bFGF レセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。

実施例 G HBsAg 粒子内部に封入するヒト RNase 発現ベクターの構築

ここでは、前記 RNase を細胞内で発現させるベクターを構築した。まず、ヒト RNase 1 遺伝子 (Seno, M., Futami, J., Kosaka, M., Seno, S. and Yamada, H. *Biochim. Biophys. Acta* 1218 (3), 466-468 1994) を鋳型にして配列番号 9 のオリゴヌクレオチド (*Xho*I サイト ctcgag を有する) と配列番号 10 のオリゴヌクレオチド (*Hind*III サイト aagctt を有する) をプライマーとして用いた PCR により、シグナルペプチドを含んだヒト RNase 1 (156 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (R0 断片) を増幅した。

次に、ヒト RNase 1 遺伝子を鋳型にして配列番号 11 のオリゴペプチド (*Xho*I サイト ctcgag を有する) と配列番号 12 のオリゴペプチド (*Hind*III サイト aagctt を有する) を用いた PCR により、シグナルペプチドを含まないヒト RNase 1 (128 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (RM 断片) を増幅した。

WO 01/64930

CT/JP01/00926

また、ヒト E C P 遺伝子 (Rosenberg HF, Ackerman SJ and Tenen DG. *J. Exp. Med.* 170 (1), 163-176 1989) を鋳型にして配列番号 13 のオリゴペプチド (*Xho*I サイト ctcgag を有する) と配列番号 14 のオリゴペプチド (*Hind*III サイト aagctt を有する) を用いた P C R により、シグナルペプチドを含んだヒト E C P (160 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (E0 断片) を増幅した。

さらに、ヒト E C P 遺伝子を鋳型にして配列番号 15 のオリゴペプチド (*Xho*I サイト ctcgag を有する) と配列番号 16 のオリゴペプチド (*Hind*III サイト aagctt を有する) を用いた P C R により、シグナルペプチドを含まないヒト E C P (133 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (EM 断片) を増幅した。

以上の操作により得られた R0, RM, E0, EM 断片を一度 pGEM-Teasy ベクター (Promega 社) にサブクローニングした後、塩基配列を確認後、*Eco*RI と *Hind*III で切断して、上記断片を含む DNA 断片を切り離し、アガロース電気泳動を用いて回収した。一方、発現ベクター pTriEx-1 (Novagen 社) を *Eco*RI と *Hind*III で開裂させたものを用意し、上記断片を TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて、それぞれ閉環結合させた。その結果、得られたプラスミドを、pTriEx-1-R0, pTriEx-1-RM, pTriEx-1-E0 及び pTriEx-1-EM と命名した。

実施例 H 培養細胞を用いたヒト RNase 発現ベクターによる細胞傷害効果

アフリカミドリサル腎臓由来 COS-7 細胞を 1×10^4 細胞ずつ 16 穴ウェルプレートの各ウェルに播種し、 37°C 、5% CO_2 存在下で 10% ウシ胎仔血清を含む D-MEM を用いて一晩培養した。翌日、pTriEx-1-R0, pTriEx-1-RM, pTriEx-1-E0 及び pTriEx-1-EM

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

の各プラスミドを0, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0 μg に分注し、3 μl の遺伝子導入用脂質 FuGene 6 (ロシュ社) と激しく混合し、さらに、血清を含まない D-MEM 培地 100 μl を加えたものを各ウェルに添加した。

37°C、5% CO₂ 存在下で10%ウシ胎仔血清を含む D-MEM を用いて二晩培養した。その後、MTT 溶液 [5mg/ml MTT (和光純薬)] を含む PBS (リン酸食塩バッファー) を100 μl ずつ各ウェルに加え、37°Cで4時間静置した後、さらに、溶解液 [0.04N 塩酸を含むイソプロパノール] を1 ml 加えて、室温で1時間振盪し、570 nm と 630 nm の吸光度を測定した。

各サンプルは3連で用意し、570 nm での吸光度を630 nm での吸光度で割った値を測定値とした。結果を表1に示した。

DNA量 (mg)	表1 生存率 (%)			
	RO	RM	EO	EM
	(シグナル付)	(シグナルなし)	(シグナル付)	(シグナルなし)
0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.2	87.9	87.8	97.4	93.3
0.5	81.3	77.7	80.8	94.9
1	77.3	84.9	86.0	89.0
5	69.2	79.7	70.0	96.7

その結果、全ての発現系において細胞傷害誘導能が観察された。

これより、これらの RNase 発現用ベクターをこの出願の発明の各種のタンパク質中空ナノ粒子に封入すれば、細胞特異的に前記の RNase が導入され、細胞内で細胞傷害効果を発揮して有効な疾患治療法となることが期待できる。

実施例1 無血清培養の昆虫細胞による HBsAg 粒子作製

WO 01/64930

CT/JP01/00926

実施例 A に記載されている遺伝子組換え酵母による HBsAg 粒子の発現は、菌体内の可溶性タンパク質の約 40% が HBsAg として産生される極めて高い効率の HBsAg 粒子生産法であるが、精製 HBsAg 粒子を得るためには実施例 B に示すような複雑な操作が必要である。また、酵母は高等動物由来のタンパク質を発現するに適している小胞体膜等のタンパク質合成系を有してはいるが、下等真核生物であるため糖鎖等の高次構造は再現できないことが知られている。

そこで、以下にバキュロウィルスを紹介し、無血清培養が可能な昆虫細胞系で HBsAg 粒子を作製する方法を説明する。

実施例 A に記載されている酵母用 HBsAg 発現プラスミド pGLDLIIP39-RcT から、配列番号 17 のオリゴヌクレオチド (*KpnI* サイト ggtacc を有する) 及び配列番号 18 のオリゴヌクレオチド (*SacII* サイト ccgcgg を有する) のプライマーを用いて PCR により、ニワトリ由来リゾチーム分泌シグナルペプチド融合型 HBsAg 遺伝子断片を増幅した。

PCR 産物をアガロース電気泳動で分離し、約 1.3 kbp の目的バンドを回収した後、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen 社) を用いて pCR2.1-TOPO (Invitrogen 社) にサブクローニングし、大腸菌 DH5 α に形質転換した。塩基配列解析により目的の遺伝子が正しく組み込まれているプラスミドを選抜し、その後、*KpnI* 及び *SacII* で処理して、アガロース電気泳動で分離後、約 1.3 kbp の *KpnI*-*SacII* 断片をアガロース電気泳動により回収した。

次に、昆虫細胞安定発現用ベクター pIZT/V5-His (Invitrogen 社) の *KpnI* サイトと *SacII* サイトの間に、上記遺伝子断片を TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて、閉環

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

結合させた。

塩基配列を確認した後、プラスミドを、p I Z T / V 5 - H i s - H B s A g と命名した。同様に、実施例 C 記載の p G L D L I I P 3 9 - R c T (n u l l) 及び実施例 D 記載の p G L D L I I P 3 9 - R c T - E G F のプラスミドから改変 H B s A g 遺伝子を抜き出し、p I Z T / V 5 - H i s に挿入し、それぞれ、p I Z T / V 5 - H i s - n u l l 及び p I Z T / V 5 - H i s - E G F と命名した。

一方、昆虫細胞 High Five 株 (BTI-TN-5B1-4: Invitrogen 社) を、約 1 ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen 社) に馴化させた。次に、p I Z T / V 5 - H i s - H B s A g を遺伝子導入用脂質 Insectin-Plus (Invitrogen 社) を用いて無血清培地に馴化させた High Five 株に形質転換した。その後、無血清培地で 27°C 48 時間培養し、抗生物質 zeocin (Invitrogen 社) を 400 µg/mL 含有する無血清培地で更に細胞が confluent になるまで 4~7 日間培養した。

1500×g、5 分間遠心により培養上清を回収し、Auszymell EIA キット (ダイナボット社) により、培地中の H B s A g 粒子の発現測定したところ、H B s A g 粒子が発現していることが確認された。

以上の様にして得られた培養上清 1 L は、限外濾過器 (使用フィルターは UK-200: ADVANTEC 社、排除分子量 200 K) で濃縮した後、陰イオン交換カラム (DEAE-Toyopearl 650M、東洋ソーダ社) により均一な H B s A g 粒子 2 mg を精製することができた。

実施例 J 抗原性を減少させた H B s A g 粒子の作製

H B s A g 粒子は接種されたヒトにおいて抗 H B s A g 抗体を惹

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

起する可能性がある。そこで、HBsAg粒子内部の主要抗原であるSタンパク質の抗原性を低下させた改変HBsAg粒子を作製した。

具体的には、HBワクチン接種者でありながらもB型肝炎を発症した患者から単離されたHBウイルスの変異型(Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC; *Lancet* 1990 Aug 11;336 (8711):325-9; Chiou HL, Lee TS, Kuo J, Mau YC, Ho MS *J Gen Virol* 1997 Oct;78 (Pt 10):2639-45)をHBsAg粒子に導入した。

実施例Aに記載されるpGLDLIIIP39-RcTプラスミドのSタンパク質部分の145番目Gly残基をArg残基に置換するため(変異部分は下線で表示)に、5'-GCTGTACAAAACCTTCGGACAGAACTGCACTTGTATTCC-3' (配列番号19)とその相補配列 5'-GGAATACAAGTGCAGTTTCIGTCCGAAGGTTTTGTACAGC-3' (配列番号20)をコードするPCR用プライマー2種類を使用して、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社)を用いたPCR法をpGLDLIIIP39-RcTプラスミドに対して行った。

具体的には、耐熱性DNAポリメラーゼとして *Pfu* DNA polymerase (Stratagene)を用い、PCRスケジュールは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返した。その後、PCR産物を制限酵素 *Dpn*Iで処理し、大腸菌DH5αに形質転換した後、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入されたpGLDLIIIP39-RcTプラスミドを選抜した。(以下、pGLDLIIIP39-RcT(G145R)と呼ぶ。)

実施例Aと同様の方法でpGLDLIIIP39-RcT(G14

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

5 R) プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg (G145R) 粒子を発現させた。

定常成長期 (培養開始から 72 時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製) を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGE を用いて分離し、銀染色並びに抗 S モノクローナル抗体 (フナコシ社) を用いる Western 法により HBsAg (G145R) の同定を行った。

これより、HBsAg (G145R) は分子量約 52 kDa のタンパク質であることが明らかになった。

実施例 B に記載の方法に従って、培地 2.5 L 由来の上記菌体 (約 26 g) から、約 20 mg の精製 HBsAg (G145R) 粒子を得た。HBsAg の S 抗原性に基づいて粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット (ダイナボット社) を用いて、HBsAg 粒子及び HBsAg (G145R) 粒子の S 抗原性を測定したところ、前者 1 に対し後者 0.2 であった。

上記 pGLDLIIP39-RcT (G145R) プラスミドの S タンパク質部分の 129 番目 Gln 残基をコ Arg 残基に置換するため (変異部分は下線で表示) に、5'-GCACGATTCCTGCTCGAGGAACCTCTATG-3' (配列番号 21) とその相補配列 5'-CATAGAGGTTCTCGAGCAGGAATCGTGC-3' (配列番号 22) をコードする PCR 用プライマー 2 種類を使用して、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いた PCR 法を pGLDLIIP39-RcT (G145R) プラスミドに対して行った。

具体的には、耐熱性 DNA ポリメラーゼとして *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) を用い、PCR スケジュールは、95℃ 30 秒間の変性、55℃ 1 分間のアニーリング、68℃ 30 分間の

WO 01/64930

CT/JP01/00926

合成反応を30回繰り返した。

その後、PCR産物を制限酵素 *Dpn* I で処理し、大腸菌 DH5 α に形質転換した後、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入された pGLDLIIP39-RcT (G145R) プラスミドを選抜した。(以下、pGLDLIIP39-RcT (Q129R, G145R) と呼ぶ。)

実施例Aと同様の方法で、pGLDLIIP39-RcT (Q129R, G145R) プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg (Q129R, G145R) 粒子を発現させた。

定常成長期（培養開始から72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製) を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗Sモノクローナル抗体（フナコシ社）を用いる Western 法によりHBsAg (Q129R, G145R) の同定を行った。

これより、HBsAg (Q129R, G145R) は分子量約52 kDaのタンパク質であることが明らかになった。

実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体（約26g）から、約20mgの精製HBsAg (Q129R, G145R) 粒子を得た。HBsAgのS抗原性に基づいて粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg (Q129R, G145R) 粒子のS抗原性を測定したところ、前者1に対し後者0.01未満であった。

以上より、HBsAg (Q129R, G145R) 粒子は低抗原

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

性であることが明らかになり、同粒子を使用して生体内でも安定した有効な物質運搬手段に適用できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、細胞または組織に特異的に物質を運搬、導入する運搬体として用いられる新しい中空ナノ粒子が提供される。この中空ナノ粒子は、特定細胞あるいは組織に対する強い感染機構を保持するものの、ウィルスゲノムを持たないため、安全性が高く、遺伝子治療やDDSとして広く応用できる。また、大量発現系を用いて生産することができ、産業上の利用性も高い。

WO 01/64930

CT/JP01/00926

請求の範囲

1. 粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子。
2. 真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子。
3. 真核細胞が酵母または遺伝子組換え酵母のいずれかから選択される請求項2の中空ナノ粒子。
4. 真核細胞が昆虫細胞である請求項2の中空ナノ粒子。
5. 粒子を形成するタンパク質がB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかの中空ナノ粒子。
6. B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質が抗原性を減少させたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である請求項5の中空ナノ粒子。
7. 生体認識分子が細胞機能調節分子であることを特徴とする請求項1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。
8. 生体認識分子が抗原であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。
9. 生体認識分子が抗体であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。
10. 生体認識分子が糖鎖であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。
11. 請求項1ないし10の中空ナノ粒子に細胞導入物質が内包されていることを特徴とする物質運搬体。
12. 細胞導入物質が遺伝子であることを特徴とする請求項11の

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

物質運搬体。

13. 細胞導入物質がタンパク質であることを特徴とする請求項11の物質運搬体。
14. 細胞導入物質が細胞内で細胞傷害性を示すRNaseである請求項11の物質運搬体。
15. 細胞導入物質が化合物であることを特徴とする請求項11の物質運搬体。
16. 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、エレクトロポレーション法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。
17. 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、超音波法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。
18. 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、単純拡散法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。
19. 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、電荷を有する脂質を用いて細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載の物質運搬体の製造方法。
20. 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法。
21. 請求項11ないし15のいずれかの物質運搬体を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法。
22. 少なくとも請求項20または21のいずれかの物質導入方法を用いて特定細胞または組織へ物質を運搬する操作を含むこと

WO 01/64930

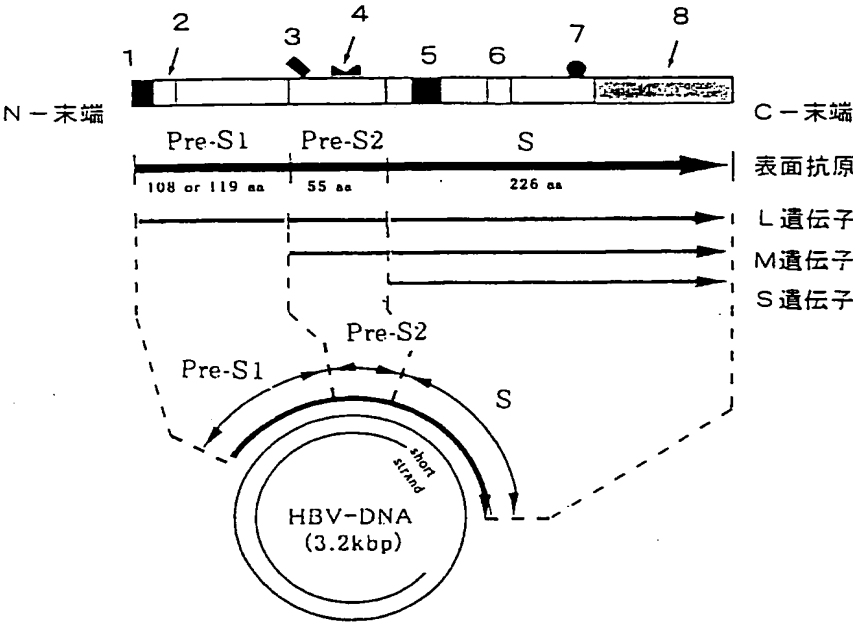
PCT/JP01/00926

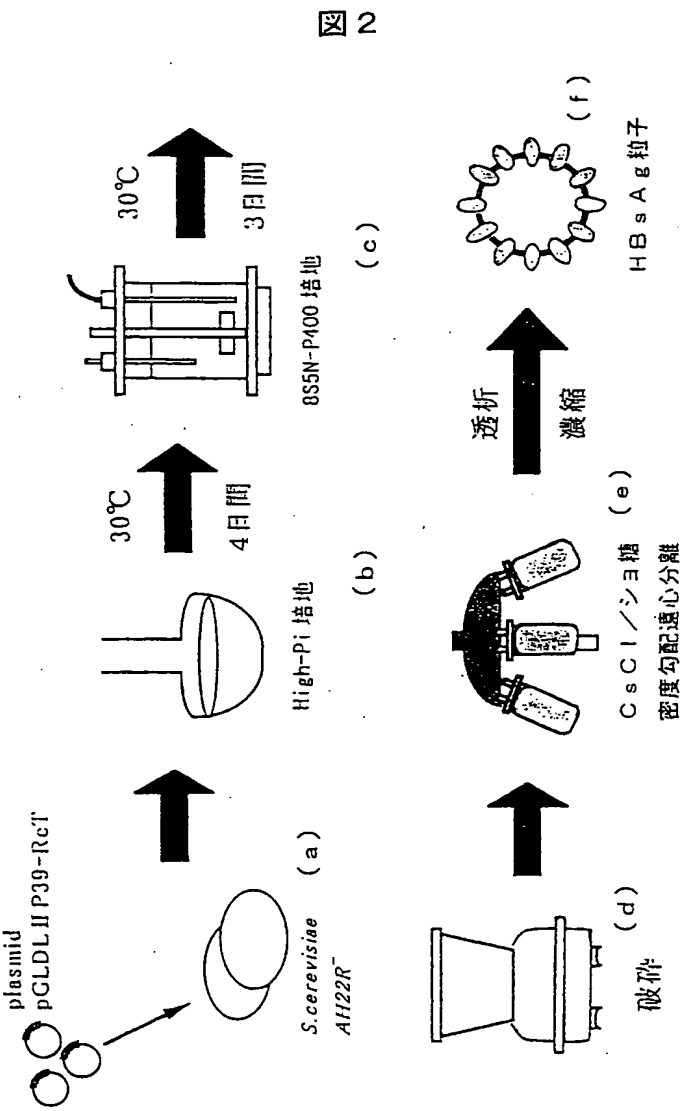
を特徴とする疾患の治療方法。

WO 01/64930

CT/JP01/00926

図 1

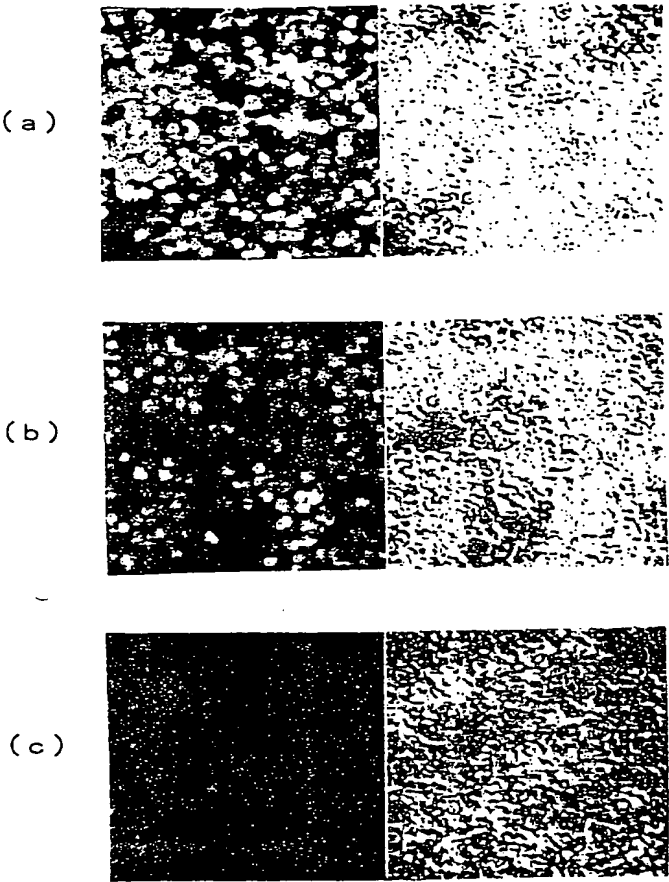




WO 01/64930

PCT/JP01/00926

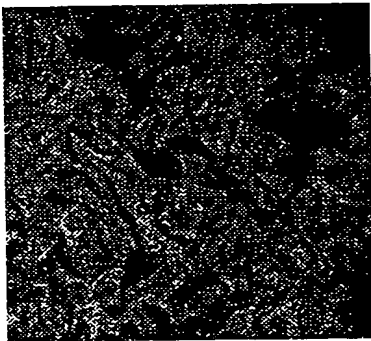
図 3



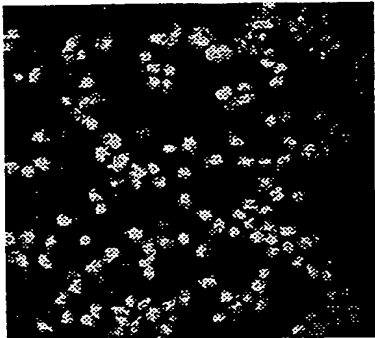
WO 01/64930

PCT/JP01/00926

図 4



(a)

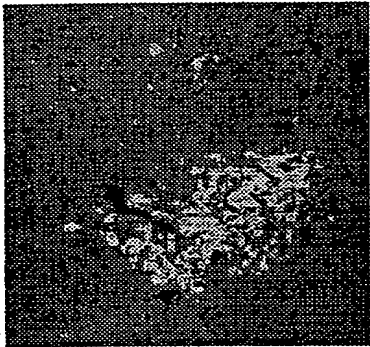


(b)

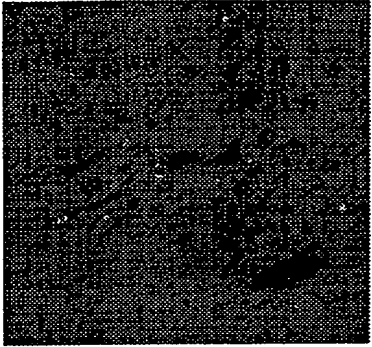
WO 01/64930

PCT/JP01/00926

図 5



(a)



(b)

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

Sequence Listing

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Protein hollow nano-particles, their use as specie carriers and method of introducing species to cell

<130> 01-F-005PCT

<160> 22

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 1

cgacaaggca tgggaggcgg ccgcagccct caggctcag 39

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 2

ctgagcctga gggctgcggc cgcctcccat gccttgctg 39

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 3

ggggcggccg catgaactct gattccg 27

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 4

gggcggccgc cagcagttc ccaccatttc 30

WO 01/64930

CT/JP01/00926

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220> Synthesized Oligopeptide
 <400> 5
 gggcggccgc ggccacttct ctaggtgc 28
 <210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220> Synthesized Oligopeptide
 <400> 6
 gggcggccgc cgtaaaacaa gtcaactc 28
 <210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220> Synthesized Oligopeptide
 <400> 7
 gggcggccgc cccgccttg cccgaggatg gc 32
 <210> 8
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220> Synthesized Oligopeptide
 <400> 8
 gggcggccgc cgctcttagc agacattgga ag 32
 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220> Synthesized Oligopeptide
 <400> 9
 ggctcgagat ggctctggag aagtctcttg 30

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 10

ccaagctttt aggtagagtc ctccacag

28

<210> 11

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 11

ggctcgagat gaaggaatcc cgggccaag

29

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 12

ccaagctttt aggtagagtc ctccacag

28

<210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 13

ggctcgagat ggttccaaaa ctgttcac

28

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 14

ccaagctttt agatggtggt atccaggtg

29

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

<210> 15
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 15
ggctcgagat gagaccccca cagtttacg 29
<210> 16
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 16
ccaagctttt agatggtggt atccaggtg 29
<210> 17
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 17
ggggtaccat gagatctttg ttgatcttg 29
<210> 18
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 18
ggccgcggtt aaatgtatac ccaaagac 28
<210> 19
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 19
gctgtacaaa accttcggac agaaactgca cttgtattcc 40

WO 01/64930

PCT/JP01/00926

<210> 20
<211> 41
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 20
ggaatacaag tgcagtttct gtccgaagg tttgtacag c 41
<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 21
gcacgattcc tgctcgagga acctctatg 29
<210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220> Synthesized Oligopeptide
<400> 22
catagagggt cctcgagcag gaatcgtgc 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Classification No.

PCT/JP01/00926

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/88, C07K14/02, C07K16/08, C12N5/10, A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61K37/02, A61K37/54, A61K31/70, A61K45/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/88, C07K14/02, C07K16/08, C12N5/10, A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61K37/02, A61K37/54, A61K31/70, A61K45/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST (JOIS), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Pumpens P., et. al., "Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development." FEBS Lett. (January, 1999), Vol.442, No.1, pp.1-6	1-21
X	Delpyroux F., et. al., "Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particles from mammalian cells." J. Mol. Biol. (1987), Vol.195, No.2, pp.343-350	1-21
X	Kuroda S., et. al., "Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in Saccharomyces cerevisiae, purification and characterization." J. Biol. Chem. (1992), Vol.263, No.3, pp.1953-1961	1-21
X	EP, 201416, A (INST PASTEUR), 12 November, 1986 (12.11.86) & FR, 2581394, A & JP, 61-258000, A & DE, 3678609, A & JP, 8-198897, A	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 March, 2001 (02.03.01)		Date of mailing of the international search report 13 March, 2001 (13.03.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP01/00926

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hanenberg H., et. al., "Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells." Nat. Med. (1996), Vol.2, No.8, pp.876-882	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP01/00926

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 22 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/00926	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl' C12N15/88, C07K14/02, C07K16/08, C12N5/10, A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61K37/02, A61K37/54, A61K31/70, A61K45/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl' C12N15/88, C07K14/02, C07K16/08, C12N5/10, A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61K37/02, A61K37/54, A61K31/70, A61K45/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
JICST (JOIS), MEDLINE (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Pumpens P., et. al., "Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development." FEBS Lett. (1999 Jan), Vol. 442, No. 1, p. 1-6	1-21	
X	Delpyroux F., et. al., "Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particles from mammalian cells." J. Mol. Biol. (1987), Vol. 195, No. 2, p. 343-350	1-21	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 02.03.01		国際調査報告の発送日 13.03.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 上條 肇 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際特許出願報告		国際出願番号 PCT/JP 01/00926	
C (続き) . 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Kuroda S., et. al., "Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in Saccharomyces cerevisie, purification and characterization." J. Biol. Chem. (1992), Vol. 263, No. 3, p. 1953-1961	1 - 2 1	
X	EP, 201416, A (INST PASTEUR) 12. 11月. 1986 (12. 11. 86) & FR, 2581394, A & JP, 61-258000, A & DE, 3678609, A & JP, 8-198897, A	1 - 2 1	
A	Hananberg H., et. al., "Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells." Nat. Med. (1996), Vol. 2, No. 8, p. 876-882	1 - 2 1	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 01/00926

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 22 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項22は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT 17条(2)(a) 及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.